

R regenerable solid phase for carrying out specific binding r actions

Patent Number: US5783455

Publication date: 1998-07-21

Inventor(s): WIEGAND ANDREAS (DE); SCHMIDTBERGER RUDOLF (DE)

Applicant(s): BEHRING DIAGNOSTICS GMBH (DE)

Requested Patent: DE4436910

Application
Number: US19950542026 19951012

Priority Number(s): DE19944436910 19941015

IPC Classification: G01N33/553

EC Classification: G01N33/543, G01N33/553

Equivalents: AU3425495, AU703940, CA2160633, EP0707211, B1, ES2135636T,
 JP8184596

Abstract

The present invention relates to a method for carrying out immunochemical reactions and to regenerable solid phases which can be used for this purpose. When use is made of precious metals, preferably gold, as the solid phase, and also of certain reducing agents or oxidizing agents, such as, for example, sodium borohydride and tetrabutylammonium hydroxide, with or without the addition of detergents, the solid phase can be employed repeatedly, following regeneration.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 44 36 910 A 1

(51) Int. Cl. 6:
G 01 N 33/543
// C12Q 1/28

DE 44 36 910 A 1

(21) Aktenz. Ich n: P 44 36 910.7
(22) Anmeldetag: 15. 10. 94
(23) Offenlegungstag: 18. 4. 96

(71) Anmelder:
Behringwerke AG, 35041 Marburg, DE

(72) Erfinder:
Wiegand, Andreas, 34613 Schwalmstadt, DE;
Schmidtberger, Rudolf, 35041 Marburg, DE

- (54) Regenerierbare Festphase zur Durchführung spezifischer Bindereaktionen
(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung immunchemischer Reaktionen sowie dafür verwendbare regenerierbare Festphasen.

DE 44 36 910 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 02. 96 602 016/334

5/26

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung immunchemischer Reaktionen sowie dafür speziell verwendbare regenerierbare Festphasen.

Immunchemische Nachweismethoden haben in der *in vitro* Diagnostik eine hohe Bedeutung erlangt. Ursache dafür ist, daß sie hochspezifisch und äußerst empfindlich sind. Zudem zeichnen sich diese Verfahren durch eine einfache Handhabung aus.

Die Nachweisverfahren beruhen auf der immunologischen Wechselwirkung zwischen dem nachzuweisenden Analyten und seinem Bindungspartner bzw. seinen Bindungspartnern.

Generell werden immunologische Reaktionen in zwei Klassen eingeteilt: in homogene Verfahren und heterogene Verfahren. Diese zwei Verfahren unterscheiden sich unter anderem dadurch, daß bei den heterogenen Verfahren ein Reaktionspartner im Überschuß angeboten wird und dieser Überschuß vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden muß. Bei den als homogenen Assays bekannten Verfahren ist eine solche Trennung nicht erforderlich, da sich die Signale der freien und gebundenen Markierung unterscheiden.

Immunchemische Verfahren und die verschiedenen Ausführungsformen sind dem Fachmann grundsätzlich bekannt.

Eine in der Proteindiagnostik weit verbreitete Methode die "bound/free" Trennung durchzuführen, besteht darin, einen Reaktionspartner adsorptiv oder kovalent an eine Festphase zu binden. Diese als "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) bekannte Technik wird in verschiedenen Varianten zum Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern verwendet.

Seit dem Bekanntwerden dieser Nachweistechnik sind immer wieder Versuche angestellt worden, die Festphase mit dem an sie gebundenen spezifischen Bindungspartner nach Ablauf der Reaktion zu regenerieren, z. B. dadurch, daß die während der Reaktion entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe dissoziert werden sollten.

Die für eine solche Dissoziation in Frage kommenden Agenzien, wie verdünnte Salz- oder Schwefelsäure, organische Säuren wie Essig- oder Propionsäure, konzentrierte Harnstofflösungen sowie Lösungen von Chaotropika wie KJ oder KSCN sind aber auch als denaturierend bekannt. Nachteilig kommt hinzu, daß die Dissoziation eines Antigen-Antikörperkomplexes mittels dieser Reagenzien nur selten vollständig und im Hinblick auf eine Wiederverwendung nach einem unakzeptablen langen Zeitraum erfolgt.

Die bisher bekannten Verfahren den Festphasen gebundenen spezifischen Bindungspartner zu regenerieren, sind trotz großer Fortschritte mit dem Nachteil behaftet, daß bei jedem Regenerierungsschritt in nicht bekanntem Ausmaß die Festphase in ihren Bindungseigenschaften verändert wurde, dadurch bedingt haben bisher diese Verfahren keine kommerzielle Verwendung gefunden.

Der vorliegenden Erfindung lag somit das technische Problem zugrunde, ein Verfahren bereit zu stellen, wodurch eine Festphase zur Immobilisierung spezifischer Bindungspartner mehrfach reproduzierbar in einem immunologischen Nachweisverfahren eingesetzt werden kann.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß bei der Verwendung von Edelmetallen, vorzugsweise Gold als Festphase sowie bestimmter Reduktions- oder Oxidationsmittel, wie z. B. Natriumborhydrid, Tetrabutylammoniumhydroxid mit oder ohne Zusatz von Detergzenzen, die Festphase nach Regeneration mehrfach eingesetzt werden kann.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird an einer Edelmetalloberfläche ein erster spezifischer Bindungspartner immobilisiert. Nach Waschung der beschichteten Oberfläche wird der Analyt mit dem immobilisierten spezifischen Bindungspartner zur Wechselwirkung gebracht und ggf. erneut gewaschen. In einem folgenden Schritt wird der immobilisierte Analyt mit einem markierten, zweiten spezifischen Bindungspartner zur Reaktion gebracht. Ggf. nach einem weiteren Waschschritt ist nun möglich, entweder direkt oder mittels einer weiteren Reaktion, eine dem Analyten äquivalente physikalische oder chemische Größe zu messen. Im folgenden Regenerationsschritt wird die Edelmetalloberfläche mittels eines wie oben beschriebenen Reagenzes von den anhaftenden Molekülen befreit und steht somit einer erneuten Beschichtung mit einem ersten spezifischen Bindungspartner zur Verfügung.

Die Erfindung eignet sich insbesondere zum Einbau in dem Fachmann an sich bekannte Geräte zu Einsatz in der Diagnostik. Vorteilhaft sind auch solche Ausführungen des Erfindungsgegenstandes, bei denen auf einen, für das Meßsignal durchlässigen Grundkörper eine für das Meßsignal ebenfalls durchlässige Edelmetallschicht angebracht wird, wobei die Signalabschwächung auch bei Kombination von Grundkörper und Edelmetallschicht bis zu 90%, bevorzugterweise bis zu 50%, ganz bevorzugterweise bis zu 20% betragen kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen im wesentlichen darin, daß nicht — wie bei dem bisherigen Stand der Technik — für jedes Experiment eine neue Festphase benötigt wird, sondern die Festphase beliebig oft eingesetzt werden kann. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entstehen viel weniger Abfallprodukte als bei dem gegenwärtigen Stand der Technik. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, dem Anwender nach dem sogenannten "random excess Prinzip" vorzugehen, d. h. es ist möglich, Experimente mit verschiedenen ersten spezifischen Bindungspartnern hintereinander durchzuführen, ohne dabei die Festphase wechseln zu müssen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Quantitative human IgE-Bestimmung nach dem Sandwich-Prinzip mit chemilumineszent-markierten Antikörpern

Testdurchführung und Regenerierung erfolgten bei einer Temperatur von +37°C.

Träger:

Rohr aus Feingold, Reinheit 99,99% der Fa. DEGUSSA,
Außendurchmesser: 1,5 mm
Innendurchmesser: 0,7 mm
Länge 200 mm

Beschichtung:

In das Rohr wurden 77 µl Lösung eines monoklonalen Antikörpers (Maus) gegen human IgE (MAK) gesaugt. Die Konzentration des MAK betrug 50 µl/ml. Die Lö-

sung enthielt außerdem 75 mM Na-Phosphat, 75 mM NaCl, 100 g/l Na₂SO₄. Der pH-Wert war 6,0. Die MAK-Lösung wurde 5 Minuten in dem Rohr belassen.

Waschschrift:

Das Rohr wurde anschließend mit 1 ml Waschpuffer, d. h. einer Lösung aus 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) und 50 mM Zitronensäure, pH 7,4 gespült. Spülzeit 1 Minute.

Probeninkubation:

77 µl definierte Mengen an IgE enthaltendes Humanserum wurde in das Rohr gesaugt und 10 Minuten darin belassen.

Waschschrift:

Das Rohr wurde anschließend mit 1 ml Waschpuffer (5 mM Na-Phosphat, 85 mM NaCl, 1 g/l Tween 20®, 0,5 g/l Phenol, pH 6,5) 1 Minute lang gespült.

Konjugat-Reaktion:

77 µl Lösung eines Konjugates (Herstellung analog Beispiel 8 aus EP-A 0 330 050) von polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) gegen human-IgE mit Acridiniumester wurden in das Rohr gesaugt und 5 Minuten darin belassen.

Die Konzentration des Konjugates war 190 ng/ml, neben 0,1 M Na-Phosphat, 0,15 M NaCl, 1 g/l h-Serumalbumin, 1,5 g/l Tego-Betain L 7®, pH 6,0.

Waschschrift:

Das Rohr wurde anschließend innerhalb 1 Minute mit 1 ml einer Lösung von 75 mM Na-Phosphat und 75 mM NaCl, pH 7,2 gespült.

Abspaltung des gebundenen Tracers:

Die Abspaltung des Tracers (Acridiniumester) erfolgt mit 77 µl einer Lösung von 0,1 M HNO₃ und 5 g/l H₂O₂ bei einer Inkubationszeit von 1 Minute.

Messung:

Der den abgespaltenen Tracer enthaltende Rohrinhalt wurde in die Meßküvette des Luminometers AUTOCLINILUMAT, Fa. BERTHOLD, überführt und durch Zugabe von 300 µl 0,25 M NaOH die Lumineszenz-Reaktion ausgelöst.

Regenerierung der Festphase:

Die Regenerierung erfolgt durch Einwirkung von 77 µl einer 10 g/l NaBH₄ enthaltenden Lösung während 1 Minute und nachfolgendem Spülen mit 1 ml einer Lösung von 75 mM Na-Phosphat und 75 mM NaCl, pH 7,2. Spülzeit 1 Minute.

Vier, nach der oben beschriebenen Methode getestete Proben mit unterschiedlichem IgE-Gehalt ergeben das in der nachfolgenden Abbildung wiedergegebene Verhältnis Signalhöhe zu IgE-Gehalt. Letzteres ist in internationalen Einheiten angegeben.

Beispiel 2

Quantitative POD-Bestimmung

Testdurchführung und Regenerierung erfolgten bei einer Temperatur von +37°C.

Träger:

Rohr aus Feingold, Reinheit 99,99% der Fa. DEGUSSA, Außendurchmesser: 1,5 mm

Innendurchmesser: 0,7 mm
Länge 200 mm

Beschichtung:

5 In das Rohr wurden 77 µl Lösung eines monoklonalen Antikörpers (Maus) gegen POD in PBS (pH 7,2) gesaugt. Nach 10minütiger Inkubationszeit wurde die Kapillare mit 2 ml einer 50 mM TRIS-Citratpufferlösung (pH 7,4) gespült.

Immunreaktion:

In die Goldkapillare wurden 77 µl einer Peroxidaselösung in IgE-Inkubationsmedium (Behringwerke AG, Marburg, Produkt Nr. OSND — 50 mM Phosphat,

15 150 mM NaCl, 5 mM Titriplex III, 0,1% RSA, 0,01% R-IgG, 10% Glycerin, 2% Tween 20, 2 mM Phenol, pH 6,8)) gesaugt. Nach 10minütiger Inkubation wurde die Kapillare mit 2 ml Waschlösung POD, Behringwerke AG, Marburg, Produkt Nr. OSEW (5 mM Phosphat, 85 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,005% Phenol, pH 6,5) gespült.

Substrataktion:

In das Rohr wurden 77 µl Chromogen POD, Behring, 25 Marburg, Produkt Nr. OWEY gelöst in Puffer POD, Behring, Marburg, Produkt Nr. OWEZ gesaugt. Nach 5minütiger Inkubationszeit wurden 50 µl der in der Kapillare enthaltenen Lösung entnommen.

Stoppt:

Die der Kapillare entnommenen 50 µl wurden mit 50 µl Stopplösung POD (Behringwerke AG, Marburg, Produkt Nr. OSFA) versetzt.

Detektion:

Extinktionsmessung der erhaltenen Lösung in einem Photometer bei 492 nm.

Regenerierung der Festphase:

Die Goldkapillare wurde mit 5 ml einer 20% Gew-% 40 Tetrabutylammoniumhydroxidlösung gespült. Anschließend wurde die Kapillare mit 1 ml einer phosphatgepufferten Kochsalzlösungen (pH 7,2) gespült.

Patentansprüche

- 45 1. Ein Verfahren zur Durchführung heterogener immunchemischer Reaktionen unter Verwendung einer regenerierbaren Festphase, bei dem ein erster spezifischer Bindungspartner reversibel direkt an die Festphase gebunden wird.
- 50 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Festphase ein Edelmetall bevorzugterweise Gold verwendet wird.
- 55 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Festphase ein mit einem Edelmetall, bevorzugterweise Gold beschichteter Träger ist.
- 60 4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1—3, wobei der erste spezifische Bindungspartner ein Immunglobulin ist.
- 65 5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1—4, wobei nach erfolgter Reaktion die Festphase dadurch regeneriert wird, daß der erste spezifische Bindungspartner mittels eines Reagens von der Festphase abgelöst wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Reagenz ein Reduktionsmittel enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Reagenz ein Oxidationsmittel enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Reagenz NaBH₄ enthält.
9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Reagenz Tetrabutylammoniumhydroxid enthält.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–9, wo-
bei die Festphase in Form eines Rohres Anwen-
dung findet. 5
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10,
welches folgende Schritte beinhaltet:
 - a) Beschichten des Trägers mit einem ersten 10
spezifischen Bindungspartner
 - b) Probeninkubation in den beschichteten Trä-
ger
 - c) Konjugatreaktion des Konjugats mit den
vorhandenen immobilisierten Analyten 15
 - d) Messung der den Analyten äquivalenten
physikalischen oder chemischen Größe
 - e) Regenerieren der Feststoffoberfläche nach
einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche
5–9. 20
12. Verwendung einer regenerierbaren Festphase
aus einem Edelmetall in einem Verfahren nach An-
spruch 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65